

VARIAÇÃO TOPOGRÁFICA DA POPULAÇÃO DE PROTEOGLICANOS EM DUAS REGIÕES DISTINTAS DA CARTILAGEM ARTICULAR DO TARSOMETATARSO DE FRANGOS

TOPOGRAPHIC VARIATION OF THE PROTEOGLYCAN POPULATION IN TWO DIFFERENT REGIONS OF CHICKEN TARSOMETARSAL CARTILAGE

DOI: 10.24933/rep.v8i1.317

v. 8 n. 1 (2024)

ESQUISATTO, Marcelo Augusto Marretto¹; BELLINE, Paula²; PIMENTEL, Edson Rosa²; GOMES, Laurecir²

¹Núcleo de Pesquisa em Ciências da Saúde, Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto – FHO, Araras, São Paulo, Brasil. ²Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

marcelosquisatto@fho.edu.br

RESUMO. A organização estrutural e a distribuição de proteoglicanos da matriz extracelular da cartilagem articular de galinhas jovens adultas foram analisadas, utilizando amostras das superfícies lateral e medial do tarsometatarso. Para análise estrutural, os cortes foram corados com Azul de Alcian e Xylidine-ponceau e analisados por microscopia de campo claro e luz polarizada. Para análise bioquímica, os componentes da matriz extracelular foram extraídos com cloridrato de guanidina 4M, dosados, fracionados por cromatografia de gel filtração e troca iônica e analisados por eletroforese em suporte de agarose, agarose-poliacrilamida e poliactilamida. A análise estrutural mostrou que as fibrilas de colágeno estavam dispostas transversalmente na periferia das duas regiões. A área central da região lateral apresentou reatividade mais intensa para Azul de Alcian. O conteúdo de ácido urônico da região lateral foi maior que a medial. A análise de glicosaminoglicanos em géis de agarose revelou a presença apenas de condroitim-sulfato. Este não apresentou diferenças em relação ao tamanho de cadeia. A análise dos grandes proteoglicanos revelou moléculas maiores na região medial. As bandas eletroforéticas correspondentes a Mr de 230, 220, 180 e 59 kDa apresentaram reatividade para Fibromodulim nas duas regiões. A banda eletroforética correspondente a 75kDa apresentou reatividade para Decorin nas duas regiões. As alterações observadas quanto a metacromasia tecidual e distribuição de proteoglicanos entre as regiões da cartilagem do tarsometatarso podem estar relacionadas a diferenças quanto a distribuição de forças mecânicas sobre a superfície articular.

Palavras-chave: Tecido conjuntivo; glicosaminoglicanos; variação anatômica.

ABSTRACT. The structural organization and distribution of proteoglycans in the extracellular matrix of the articular cartilage of young adult chickens were analyzed using samples from the lateral and medial surfaces of the tarsometatarsus. For structural analysis, the sections were stained with Alcian Blue and Xylidine-ponceau and analyzed by bright field and polarized light microscopies. For biochemical analysis, the components of the extracellular matrix were extracted with 4M guanidine hydrochloride, dosage, fractionated by gel filtration and ionic Exchange chromatographies and analyzed by electrophoresis on agarose, agarose-polyacrylamide and polyacrylamide supports. The structural analysis showed that the collagen fibrils were arranged transversally on the periphery of the two regions. The central area of the lateral region showed more intense reactivity to Alcian Blue. The uronic acid content of the lateral region was higher than the medial region. Analysis of glycosaminoglycans in agarose gels revealed the presence of only chondroitin sulfate. This showed no differences in relation to chain size. Analysis of large proteoglycans revealed larger molecules in the medial region. The electrophoretic bands corresponding to Mr of 230, 220, 180 and 59 kDa

showed reactivity for Fibromodulin in both regions. The electrophoretic band corresponding to 75kDa showed reactivity for Decorin in both regions. The changes observed regarding tissue metachromasia and distribution of proteoglycans between the regions of the tarsometatarsal cartilage may be related to differences in the distribution of mechanical forces on the articular surface.

Keywords: Connective tissue; glycosaminoglycans; anatomical variation.

INTRODUÇÃO

A cartilagem articular (CA) recobre as epífises ósseas nas juntas sinoviais. Ela contribui para a redução expressiva do atrito na superfície articular, bem como é capaz de suportar às forças compressivas empreendidas durante o movimento. A matriz extracelular (MEC) do tecido cartilaginoso é constituída por proteoglicanos (PGs) de alto peso molecular (LPG) mergulhados dentro de uma rede fibrilar de colágeno do tipo II. Embora o LPG (aggrecan) seja a forma predominante em termos de massa, a MEC também apresenta cerca de 1% em massa dos pequenos PGs. Essas moléculas incluem dois dermatam-sulfato (DS-PG) - Biglicam (BG) e Decorin (DC) - e um queratam-sulfato (KS-PG), Fibromodulin (FM) (ULRICH-VINTHER *et. al.*, 2003).

A síntese do aggrecan e do colágeno do tipo II pelos condrócitos é considerada como marcadores específicos para cartilagem hialina. Por outro lado, a alteração nesse padrão de síntese reflete a adaptação dessas células a novas situações fisiológicas. Os eventos a que os condrócitos são sensíveis incluem situações mecânicas adversas nas juntas como a imobilização e compressões estáticas de grande amplitude bem como situações experimentais *in vitro* como a cultura em meios unidimensionais por períodos prolongados. A alteração no padrão tecidual em relação aos PGs nestas situações é a acentuada diminuição na síntese do aggrecan e estímulo à produção dos DS-PG. Muitas dessas alterações metabólicas experimentais são observadas na patologia da osteoartrite (CARBALLO *et. al.*, 2017).

As juntas sinoviais apresentam os mesmos componentes anatômicos e a mesma estrutura geral entre os correspondentes funcionais nas várias espécies. Por outro lado, ficou demonstrado em estudos com AC normal de mamíferos que o tecido apresenta grande heterogeneidade morfológica e bioquímica. Ele varia em espessura, densidade de células, composição da ECM e propriedades mecânicas dentro da mesma junta, entre juntas e entre diferentes espécies (KHAN *et. al.*, 2007).

Embora a MEC da cartilagem articular de diferentes vertebrados tenha composição básica semelhante, a matriz varia na composição e organização, dependendo do peso corporal, postura e atividade física. Estudos realizados com a cartilagem articular de mamíferos (ESQUISATTO; PIMENTEL; GOMES, 1997; ESQUISATTO *et. al.*, 2023) e aves (TOMIOSSO *et. al.*, 2005; RODRIGUES *et. al.*, 2005) demonstram claramente estas variações. Estas particularidades demonstram que o padrão metabólico dos condrócitos pode variar de acordo com o estímulo, bem como os mecanismos adaptativos de resposta da matriz cartilaginosa (LIN *et. al.*, 2006).

Neste sentido, estudos envolvendo a caracterização da MEC e a análise comparativa entre os vertebrados pode contribuir para ampliar o entendimento da biologia dos tecidos conjuntivos e a possível proposição de novos métodos de reparo em condições patológicas humanas e de interesse veterinário (GOLDRING *et. al.*, 2006).

A partir desse contexto, os objetivos desse estudo foram descrever a organização estrutural do tecido cartilaginoso e caracterizar as populações de PGs presente na cartilagem articular das regiões lateral e medial do tarsometatarso de galinhas jovens adultas.

METODOLOGIA

Reagentes

Os reagentes analíticos, o condroitim-sulfato (CS) de cartilagem de baleia, o dermatam-sulfato (DS) de pele de porco, o heparam-sulfato (HS) de intestino de porco, a glucuronolactona e albumina bovina (BSA) foram adquiridas da Sigma-Aldrich®. DEAE-Sephacel, Sephadex G-75 e o padrão de peso molecular foram comprados da Bio-Rad®. Os softwares utilizados estes trabalhos foram licenciados de Microsoft Windows®. Os anticorpos primários: anti-decorina humana (ab137508) e anti-fibromodulina humana (ab267465) e anticorpos secundários específicos marcados (ab6789) foram adquiridos da ABCAM®.

Material Biológico

Cartilagem articular fresca foi extraída da epífise proximal do tarsometatarso de quinze galinhas com 45 dias de idade, recém abatidas, da raça *Hyline* obtidas em abatedouro comercial da cidade de Jaguariúna/SP. A criação, manutenção, transporte e critérios de abate dos animais seguiram as normas previstas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e da Secretaria Estadual de Agricultura do Estado de São Paulo. A superfície articular da epífise proximal do tarsometatarso foi dividida em regiões lateral (TMTl) e medial (TMTm).

Os fragmentos da cartilagem articular das duas regiões foram colocados em solução fixadora para posterior análise estrutural (cinco animais) ou congelados a -20°C para análise bioquímica (dez animais). A cartilagem articular saudável apresentava coloração branca e aspecto cristalino liso.

Análise estrutural

Os fragmentos de cartilagem das duas regiões foram fixados em paraformaldeído 4% em tampão Millonig, pH 7,4, por 24h e depois processados para inclusão de rotina em parafina Histosec/Paraplast Plus (Merck). Seções de $7\mu\text{m}$ de espessura foram cortadas tangencialmente à superfície articular e coradas pelas soluções aquosas de Azul de Alcian 1% em ácido acético 3%, pH 2,5 e Xylidine-ponceau 0,1% em ácido acético 3%, pH 2,5. Os cortes foram analisados e documentados em fotomicroscópio Zeiss utilizando campo claro e luz polarizada. Neste último, a birrefringência é obtida posicionando o polarizador e o material em um ângulo de 45° entre ambos.

Extração dos componentes da ECM

A cartilagem obtida (1g) de cada região foi fragmentada em pedaços com aproximadamente 1 mm^3 e tratados com 15 volumes (peso/volume) de cloridrato de guanidina 4M em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,8 contendo EDTA 10mM e PMSF 1mM. A solubilização das moléculas a partir do tecido foi realizada por 24h a 4°C sob agitação. O extrato foi separado do tecido residual por centrifugação a 4°C a 18.000 rpm por 15 min em rotor Beckman JA-20.

Quantificação dos componentes solubilizados

O conteúdo proteico total foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando BSA para padrão. Os PGs foram quantificados pelo conteúdo total de ácido urônico (UA) (DISCHE, 1947) e por meio de glicosaminoglicanos sulfatados (GAG) – Método DMMB (FARNDALÉ *et al.*, 1986) utilizando glucuronolactona e CS como padrões, respectivamente.

Análise cromatográfica e eletroforética dos LPGs

Os LPGs extraídos foram fracionados em coluna de gel filtração Sepharose CL-4B (2 x 120 cm) equilibradas no mesmo tampão utilizado para extração. A coluna foi eluída com 20mL/h do tampão de extração e amostras de 2,0mL foram coletadas e monitoradas pelo método do DMMB. As

amostras eluídas da coluna foram precipitadas com nove volumes de etanol a 4°C por 24h e novamente lavadas em etanol para completa remoção do tampão de extração. Essas alíquotas foram então incubadas em tampão Tris-acetato 10mM pH 6.8 contendo EDTA 10mM e sulfito de sódio 250mM em glicerol 40% durante 10min em água fervendo. Essas amostras foram então submetidas a eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida (0,6/1,2%) no mesmo tampão a que foram solubilizadas durante 18h a 4°C e 50V. Os géis após a corrida foram imediatamente corados com solução de Azul de Toluidina (AT) 0,02% em ácido acético 3% por 5 min e documentados. A migração das moléculas foi comparada com o padrão CS.

Análise cromatográfica e eletroforética dos pequenos PGs (DC e FM)

Para obtenção dos pequenos PGs, alíquotas do extrato foram dialisadas contra 100 volumes (2x) do tampão Tris-HCl 20mM pH 7.4 contendo Uréia 7M e submetidas a coluna de DEAE-Sephacel (3mL) equilibrada no mesmo tampão. Após a aplicação da amostra a coluna foi lavada com 5 volumes de tampão para remoção do material não-ligado. As moléculas ligadas foram eluídas com gradiente de NaCl de 0-1,5M no mesmo tampão. O material eluído foi monitorado pela absorvância em 280nm. Alíquotas das frações eluídas após gradiente foram precipitadas com nove volumes de etanol a 4°C durante 18h e solubilizados em tampão Tris-glicina 25mM pH 6,8 contendo 0,01% de azul de bromofenol e 2% de SDS na presença e ausência de 0,2 % β -mercaptoetanol. Estas amostras foram então analisadas em gel de poliacrilamida (gradiente 4-16%) segundo ZINGALES e colaboradores (1984) A corrida ocorreu durante 3h30min à temperatura ambiente sob corrente de 30 mA. Após a corrida os géis foram fixados em metanol 40%, ácido acético 8% e corados pelo método da prata (BLUM *et al.*, 1987). Após isso, os géis foram tratados com a solução de metanol/glicerol (40/5%) por 18h e documentados para análise da Massa relativa aparente (M_r) utilizando padrão de peso molecular conhecido.

Immunoblotting

Alíquotas das frações contendo os pequenos proteoglicanos (FM e DC) foram submetidas a nova eletroforese em mini-gel de poliacrilamida (7,5%) em tampão já descrito acima e transferido para membrana de nitrocelulose. The *western blotting* foi feito segundo descrição de TOWBIN, STAEBELIN, GORDON (1979). Anticorpos anti-FM e anti-DC foram usados na diluição 1/100. A detecção da interação foi feita com anticorpos secundários marcados com peroxidase e revelados com diaminobenzidina (DAB).

Análise cromatográfica e eletroforética dos glicosaminoglicanos (GAGs)

Amostras de extratos de duas regiões foram precipitadas com nove volumes de etanol durante 24h a 4°C. O precipitado foi tratado com NaOH 0,05M a 4°C durante 18h para liberação das cadeias de GAG do esqueleto proteico dos PGs (β -eliminação). Após esse procedimento as amostras foram novamente precipitadas com etanol e suspensas em água destilada. Para análise qualitativa dos GAGs, alíquotas foram submetidas a eletroforese de agarose (0,6%) em tampão propileno-diamino 20.mM pH 8,6 segundo DIETRICH & DIETRICH (1976) e comparadas com o padrão de migração de moléculas conhecidas. A avaliação do tamanho das cadeias de GAGs foi feita pelo fracionamento em coluna de Sephadex G-75 (2 x 12 cm) equilibrada em salina (NaCl 0,15M). A coluna foi eluída com 10mL/h de salina e amostras de 1 mL foram coletadas e monitoradas pelo método do DMMB. Alíquotas das frações eluídas da coluna foram precipitadas com etanol e dissolvidas em tampão barbiturato de sódio 20mM pH 8,6 com glicerol 40%. Essas amostras foram submetidas em seguida a eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) no mesmo tampão durante 1h30min com 100V a temperatura ambiente. Após a corrida os géis foram imediatamente corados com solução de AT já descrita anteriormente. A migração das cadeias de GAGs foi comparada ao padrão CS.

Análise Estatística

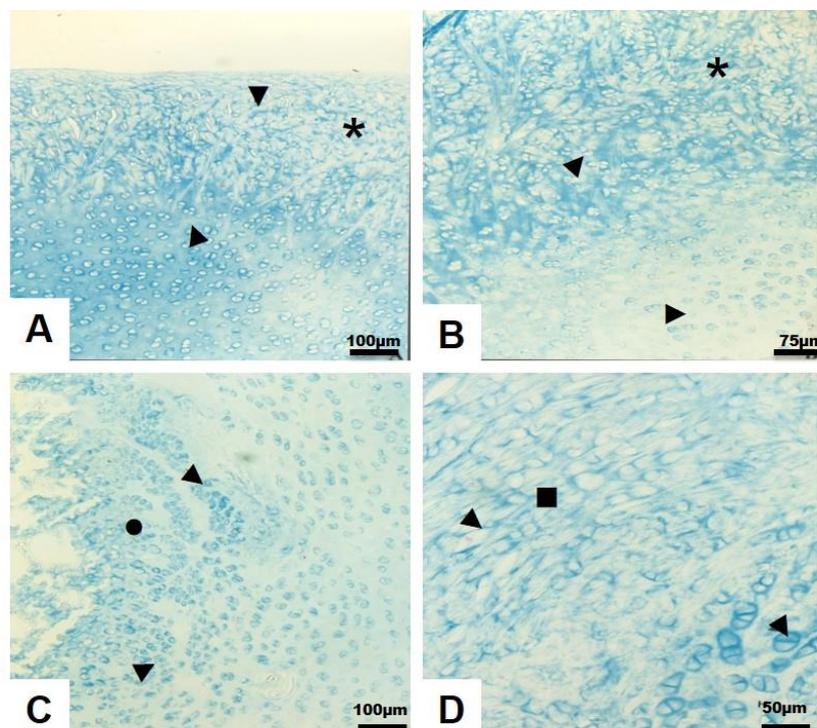
Os dados quantitativos entre as amostras das duas regiões da cartilagem articular foram comparados pelo teste *t* de *student*. As diferenças foram consideradas ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise estrutural

O exame das seções coradas com Azul de Alcian das regiões TMTl e TMTm por microscopia de campo claro (Figura 1A - D) demonstrou que a área central da superfície articular é ocupada por cartilagem hialina e a periferia apresenta componentes fibrosos correspondentes a feixes de colágeno associado à material metacromático (fibrocartilagem). A região TMTl parece apresentar maior metacromasia na região central (Figura 1A) em comparação à região medial (Figura 1C). As duas regiões apresentaram semelhanças quanto à intensidade da metacromasia na matriz pericelular dos condrócitos (área central) e fibrocondrócitos (periferia).

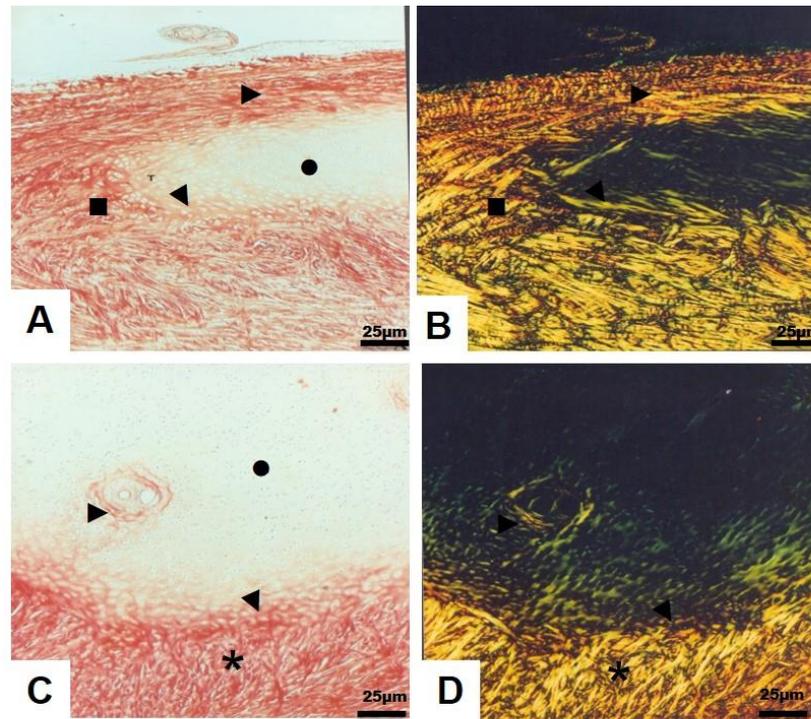
Figura 1. Micrografias de cortes transversais da cartilagem articular do tarsometatarso (TMT) no tornozelo de galinhas Hyline com 45 dias de idade. Em A e B, detalhes da região lateral do TMT e em C e D da região medial. A cabeça da seta aponta para a reação basofílica da matriz extracelular. O asterisco indica região de fibrocartilagem na região superficial da cartilagem articular. O círculo sólido mostra a cartilagem hipertófica e o quadrado sólido marca a região de transição entre o menisco e a cartilagem articular. Técnica: Azul de Alcian. As barras indicam as dimensões.



Fonte: Próprio autor.

A análise desses mesmos cortes por microscopia de luz polarizada (Figura 2A - D) mostrou fibras com birrefringência acentuada na periferia da superfície articular (fibrocartilaginosa), sugerindo que estavam organizadas e orientadas preferencialmente paralelamente ao sentido ântero-posterior das regiões lateral e medial do tarsometatarso. Além dessas fibras, havia fibrilas dispostas obliquamente ao eixo ântero-posterior na região central da superfície articular.

Figura 2. Micrografias de cortes transversais da cartilagem articular do tarsometatarso (TMT) no tornozelo de galinhas Hyline com 45 dias de idade. Em A e B, detalhes da região lateral do TMT e em C e D da região medial. A cabeça da seta aponta para a reação acidofílica da matriz extracelular (fibras de colágeno). O asterisco indica região de fibrocartilagem na região superficial da cartilagem articular. O círculo sólido mostra a cartilagem hialina e o quadrado sólido marca a região de transição entre o menisco e a cartilagem articular. Técnica: Método Xylidine-ponceau analisado em campo claro (A e C) e sob luz polarizada (B e D). As barras indicam as dimensões.



Fonte: Próprio autor.

Quantificação dos componentes da MEC

O total (em mg/mL) de proteínas, ácido urônico e glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) foi determinado dos extratos de TMTl e TMTm (Tabela 1). Não houve diferença significativa no conteúdo de proteínas e GAGs entre as regiões. Contudo, em consideração ao AU, a quantidade foi significativamente mais elevada em TMTl.

Tabela 1. Determinação do conteúdo de proteínas totais, ácido urônico (UA) e glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) das regiões lateral (TMTl) e medial (TMTm) da cartilagem articular do tarsometatarso de galinhas Hyline com 45 dias de idade. A quantificação foi feita a partir dos extratos Gu-HCl de tecido fresco. O asterisco indica valores significativamente diferentes após teste *t* com 5% de nível de significância.

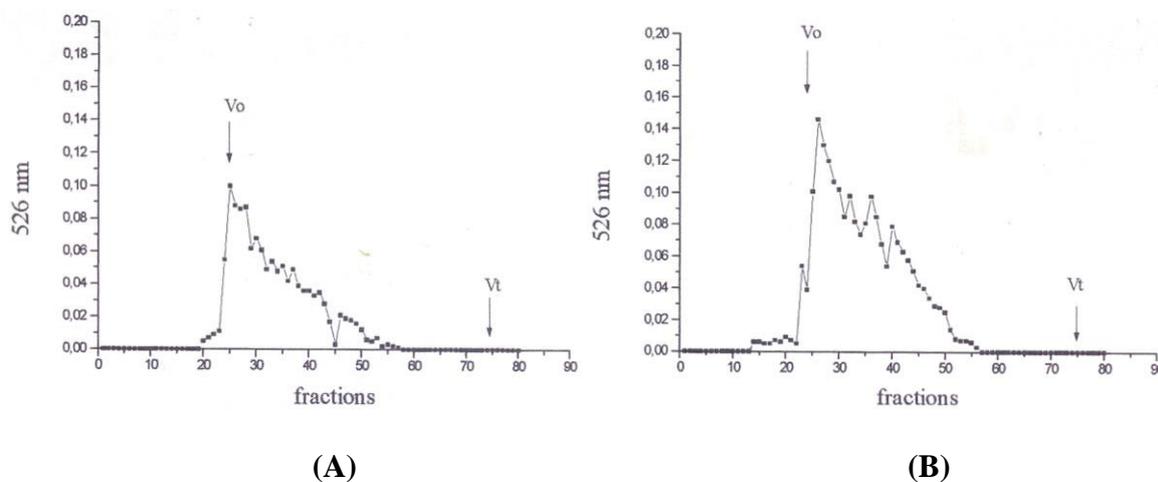
Dosagem	Regiões	
	TMTl	TMTm
Proteína total (mg/mL)	1,12 ± 0,21	1,07 ± 0,13
Ácido Urônico (*) (mg/mL)	0,56 ± 0,09	0,38 ± 0,04
GAGs sulfatados (mg/mL)	1,27 ± 0,34	1,25 ± 0,05

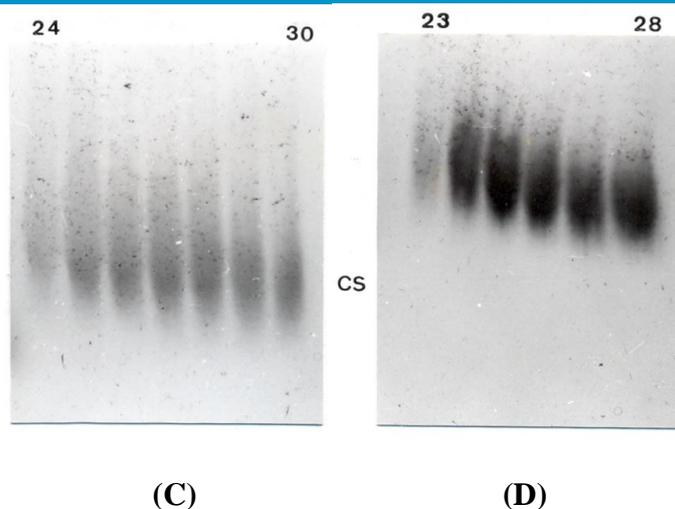
Fonte: Próprio autor.

Grandes proteoglicanos (LPG) e GAGs solúveis ao Gu-HCl

Os LPGs foram obtidos a partir de amostras submetidas a cromatografia de gel filtração em Sepharose CL-4B e analisadas em gel de agarose-poliacrilamida (Figura 3A - D). Em TMTm, os LPGs apresentam maior Mr, pois foram eluídos com o V_0 menor (B) e apresentaram migração menos polidispersa em gel de eletroforese (D). Já os LPG de TMTl foram eluídos com $K_{av} = 0,08$ (A) e a migração em gel foi mais polidispersa em relação ao TMTm (C).

Figura 3. Cromatogramas resultantes após a gel filtração em Sepharose CL-4B dos extratos totais das regiões TMTl (A) e TMTm (B) da cartilagem articular do tarsometatarso de galinhas Hyline com 45 dias de idade. A absorbância foi medida a 526nm. V_0 – volume vazio; V_t – volume total. Eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida das frações eluídas da coluna dos extratos totais das regiões TMTm (C) e TMTl (D). Padrão: CS – Condroitim-sulfato com Mr em torno de 40 kDa.





Fonte: Próprio autor.

A caracterização dos GAGs foi feita após β -eliminação das amostras do extrato total. A eletroforese em gel de agarose em tampão propileno-diamino demonstrou que o condroitin-sulfato (CS) é o principal glicosaminoglicano presente nas duas regiões (Figura 4).

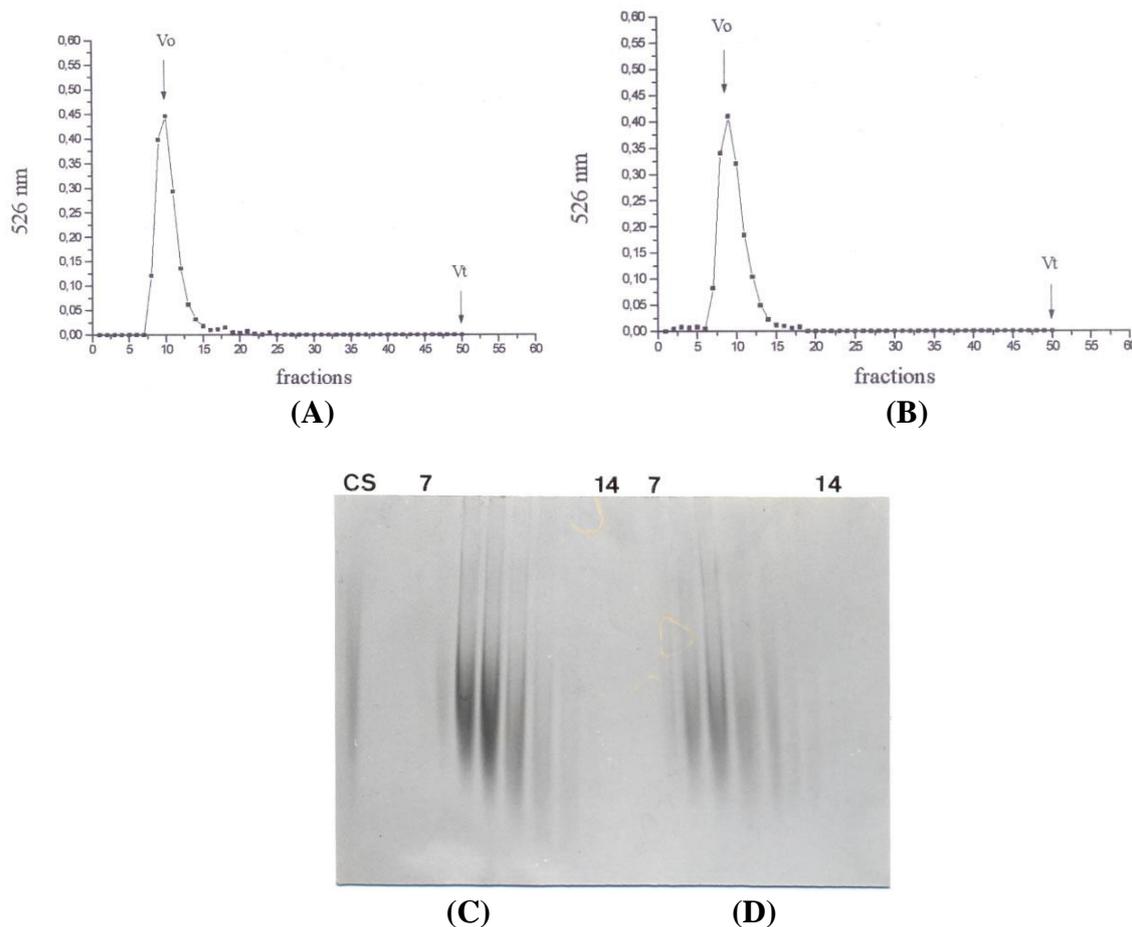
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose com tampão propileno-diamino dos extratos das regiões TMTI e TMTm da cartilagem articular do tarsometatarso de galinhas Hyline com 45 dias de idade. Padrão: CS – condroitim-sulfato, DS – Dermatam-sulfato.



Fonte: Próprio autor.

A eluição das cadeias de glicosaminoglicanos no V_0 em gel filtração utilizando Sephadex G-75 demonstrou que a M_r das cadeias é semelhante. Esse dado foi confirmado em gel de poliacrilamida, quando as moléculas apresentaram peso molecular ao redor de 40 kDa (Figura 5).

Figura 5. Cromatogramas resultantes após a gel filtração em Sephadex G-75 dos extratos totais, após β -eliminação, das regiões TMTI (A) e TMTm (B) da cartilagem articular do tarsometatarso de galinhas Hyline com 45 dias de idade. A absorbância foi medida a 526nm. V_0 – volume vazio; V_t – volume total. Eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando tampão barbital das frações eluídas da coluna dos extratos totais das regiões TMTI (C) e TMTm (D). Padrão: CS – Condroitim-sulfato com Mr em torno de 40 kDa.

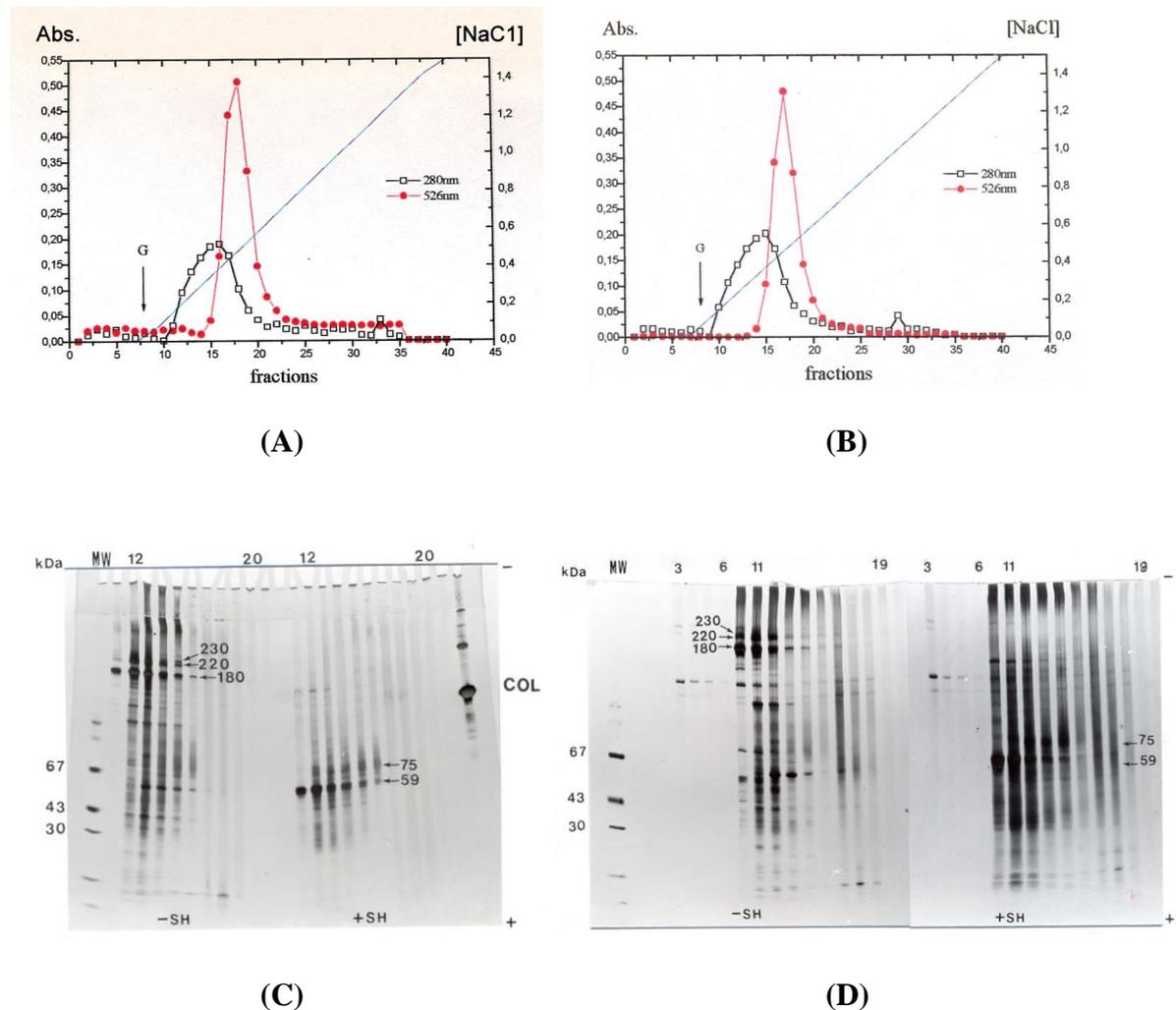


Fonte: Próprio autor.

Caracterização dos pequenos PGs (FM e DC)

Para identificação dos pequenos PGs, os extratos de TMTI e TMTm foram fracionados em coluna de DEAE-Sephacel. O padrão cromatográfico para as duas regiões foi similar (Figura 6A - B) com os picos correspondendo a proteínas e GAGs sulfatados, eluídos com 0.37 e 0.48 M de NaCl, respectivamente. O material eluído pelo gradiente foi analisado em SDS-PAGE, gradiente de 4-16%. Foram observadas bandas entre 250 e 16 kDa para as duas regiões (Figura 6C - D). Em condições não-redutoras são observadas, com destaque, bandas com 230, 220, 180, 75 e 59 kDa. Essas moléculas foram eluídas com molaridade entre 0.2 e 0.4 M. Na presença de agente redutor as três bandas de maior peso desaparecem intensificando a de 59 kDa.

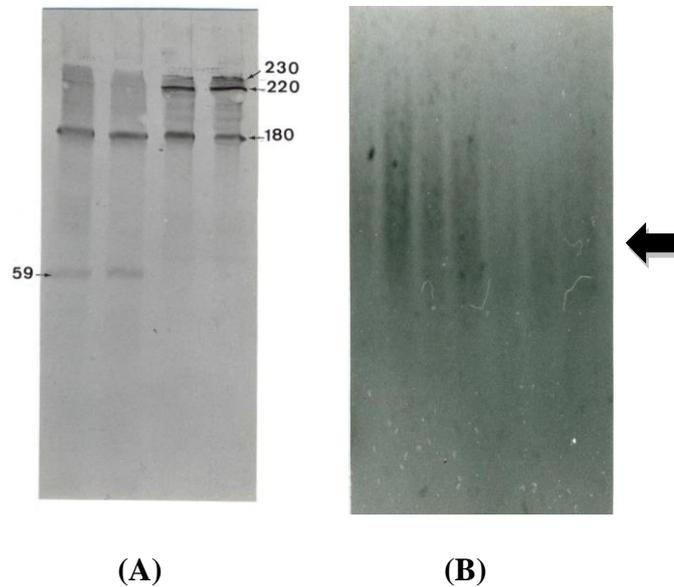
Figura 6. Cromatogramas dos extratos totais das regiões TMTI (A) e TMTm (B) da cartilagem articular do tarsometatarso de galinhas Hyline com 45 dias de idade após fracionamento em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel. A absorvância foi medida a 280 nm. A seta indica o início do gradiente de NaCl 0-1,5 M (G). Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS das frações eluídas da coluna dos extratos totais das regiões TMTI (C) e TMTm (D). Padrão: CS – Sulfato de condroitina com Mr em torno de 40 kDa.



Fonte: Próprio autor.

Ensaio imunológico, usando anti-FM, mostrou reações positivas para os componentes com 230, 220, 180 e 59 kDa (Figura 7A). Outro ensaio, utilizando anti-DC, foi realizado (Figura 7B). Este último mostrou reatividade positiva para a molécula com migração polidispersa ao redor de 75 kDa.

Figura 7. Reação por imunoblotting para Fibromodulim (A) e Decorim (B) após eletroforese em SDS-PAGE. A tira de nitrocelulose foi tratada com anticorpos primários: anti-fibromodulim (ABCAM, ab267465) e anti-decorim (ABCAM, ab137508). Em seguida, as reações foram reveladas utilizando anticorpos secundários marcados (ABCAN, ab6789) para reação com diaminobenzidina. Seta: reação positiva para Decorim.



Fonte: Próprio autor.

As propriedades biológicas e mecânicas da cartilagem articular dependem do arranjo tecidual e das interações mantidas pelos condrócitos e a matriz que sustenta o tecido (GOLDRING *et al.*, 2006). Durante o processo de desenvolvimento o tecido cartilaginoso apresenta continua remodelação. Os condrócitos degradam e sintetizam macromoléculas da matriz dependendo do estímulo a que são submetidos (KHAN *et al.*, 2007). Dentre estes estímulos destaca-se a ação de forças mecânicas (CHEN *et al.*, 2013). Diversos experimentos têm mostrado que a síntese de moléculas da MEC pelos condrócitos reflete o nível de atividade e a carga a que as juntas são submetidas (SLOWMAN, BRANDT, 1986; VISSER *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1994 SCOTT, PANITCH, 2013).

Dentro das classes de vertebrados, as principais articulações apresentam diversas modificações estruturais que permitiu aos animais se adaptarem as diversas situações posturais e de movimento. Mesmo apresentando complexas relações mecânicas durante o movimento, pode-se relatar vários exemplos de analogia estrutural entre juntas de diferentes classes de vertebrados (BARNETT, 1954; MEYERS, 2019).

No presente estudo, a cartilagem articular do tarsometatarso de galinhas jovens adultas foi analisada com objetivo de se determinar diferenças na organização da matriz extracelular com relação a diferentes regiões da mesma superfície articular. Funcional e estruturalmente esta junta é comparada ao joelho de mamíferos (BARNETT, 1954). Em ambas as juntas, é observada estruturas cartilaginosas (“meniscos”) que se interpõe entre as superfícies articulares. No entanto, na galinha, analisado aqui, há apenas menisco sob a superfície lateral do tarsometatarso enquanto medialmente o mesmo se apresenta fundido a superfície articular. Sob estas condições a organização da MEC responde às demandas funcionais por meio da adaptação da cartilagem articular (KHAN *et al.*, 2007).

Para avaliar a susceptibilidade do tecido a ação de agentes caotrópicos, foram quantificados o conteúdo de proteínas, ácido urônico (AU) e glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs). A região TMTI apresentou maior conteúdo de AU. Contudo, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros parâmetros. No entanto, foi observado uma característica interessante entre as regiões

quando se observa a razão entre o conteúdo de GAG e AU. A região TMTm parece apresentar PGs mais sulfatados.

Essas diferenças regionais demonstram a heterogeneidade na população de condrócitos nas diferentes regiões analisadas. A variabilidade na resposta metabólica, que se reflete pela ação do agente de extração, é um fenômeno diretamente relacionado a atuação de forças mecânicas (ESQUISATTO; PIMENTEL; GOMES, 1997; ESQUISATTO *et al.*, 2023; LITTLE, GHOSH, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2005; TOMIOSSO *et al.*, 2005).

Além disso, a avaliação qualitativa dos extratos quanto a população de proteínas e proteoglicanos solúveis detectou outras variações topográficas entre as regiões. Os LPGs foram avaliados em relação ao padrão de eluição em cromatografia de gel filtração e padrão de migração em gel de agarose-poliacrilamida. As moléculas analisadas da região TMTm apresentaram uma Mr aparentemente maior que TMTI. O padrão de migração em gel foi mais polidisperso e extenso para TMTm em relação a TMTI. Estas observações sugerem que a síntese dessas macromoléculas difere entre as duas regiões. Estas variações devem estar relacionadas à quantidade de cadeias de GAGs ligadas ao esqueleto proteico dos PGs.

Os GAGs, por outro lado, não apresentaram variações qualitativas. O GAG predominante em ambas as regiões foi o condroitim-sulfato e suas cadeias polissacarídicas apresentaram Mr ao redor de 40 kDa. Estes fatos parecem indicar que as diferenças no comportamento dos PGs se referem provavelmente as variações no grau de sulfatações dos GAGs ligado ao esqueleto proteico.

A expressão dos pequenos PGs FM e DC parece não se alterar entre as duas regiões. Contudo, o FM é detectado em formas que se assemelham a agregados triméricos e talvez tetraméricos. Estes agregados são reconhecidos pelo Ac anti-FM em ambas as regiões e desaparecem quando as amostras são tratadas com agentes redutores.

Este comportamento foi originalmente detectado “in vitro” por LIU *et al.* (1994) e posteriormente em extratos obtidos de cartilagem articular de boi (GOMES *et al.*, 1996). Muito pouco se sabe a respeito dos aspectos funcionais desses agregados na matriz cartilaginosa. Contudo, eles são obtidos preferencialmente de regiões submetidas a compressão dinâmica durante o movimento da junta.

Todos os dados observados neste estudo vêm confirmar a ação das cargas mecânicas sobre a organização da matriz. Em juntas normais, esses efeitos foram intensamente avaliados em mamíferos (SCHNEIDERMAN, KERET, MAROUDAS, 1986; SLOWMAN, BRANDT, 1986; ROBERTS *et al.*, 1986; KIVIRANTA *et al.*, 1992). Nestas condições, as células das regiões submetidas a uma intensidade de carga apresentam organelas hipertróficas e um volume citoplasmático aumentado, que está associado ao aumento da taxa metabólica (EGGLI, HUNZIKER, SCHENK, 1988).

Por isso a dependência metabólica dos condrócitos da ação de forças mecânicas se torna mais evidente em experimentos onde animais são treinados ou apresentam seus membros imobilizados (KIVIRANTA *et al.*, 1992). O metabolismo das macromoléculas da matriz nestas condições se altera, variando do aumento do grau de sulfatações dos GAGs até maior deposição de PGs em compressões dinâmicas (SAH *et al.*, 1992). Por outro lado, a imobilização da junta está associada a perda progressiva dos PGs da matriz cartilaginosa (PALMOSKI, PERRICONE, BRANDT, 1979; JURVELIN, HELMIN, LAURITSALO, 1985; SÖMANEN *et al.*, 1987).

Embora os eventos intra e extracelulares estejam associados (URBAN, 1994), pouco se sabe a respeito dos mecanismos de transmissão de sinal ligados a eles. No entanto, alguns fenômenos celulares como a associação e dissociação do citoesqueleto, exocitose, síntese proteica e transporte de membrana são sensíveis a variação de carga mecânica (HALL; URBAN; GEHL, 1991) e podem explicar as diferenças no padrão de síntese dos condrócitos.

CONCLUSÃO

Diante dos dados observados, foi possível concluir que a cartilagem articular da superfície articular do tarsometatarso de galinhas adultas jovens apresenta organização estrutural e resposta tecidual diferenciada em resposta às demandas funcionais específicas, similar à observada em mamíferos em condições biomecânicas similares. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar a resposta desse tecido às condições experimentais já aplicadas em modelos experimentais envolvendo juntas sinoviais de mamíferos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Hermínio Ometto (FHO) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- BARNETT, C.H. A comparison of the human knee and avian ankle. **Journal of Anatomy**, v. 88, n. 1, p. 59 -70, 1954.
- BLUM, B.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 1, p. 93-99, 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 3, p. 248-254, 1976.
- CAMILA B. CARBALLO, C. B.; NAKAGAWA, Y.; SEKIYA, I.; RODEO, S. A. Basic Science of Articular Cartilage. **Clinics in Sports Medicine**, v. 36, n. 3, p. 413-425, 2017.
- CHEN, C.; TAMBE, D. T.; DENG, L.; YANG, L. Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte. **American Journal of Physiology**, v. 305, n. 12, p.1202 – 1208, 2013.
- DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 645-647, 1976.
- DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. **Journal Biological Chemistry**, v. 167, n. 1, p. 189-199, 1947.
- EGGLI, P.S.; HUNZIKER, E.B.; SCHENK, R.K. Quantification of structural features characterizing weight- and less- weight-bearing regions in articular cartilage: a stereological analysis of medial femoral condyles in young rabbits. **Anatomical Records**, v. 222, n. 3, p. 217-227, 1988.
- ESQUISATTO, M.A.M.; PIMENTEL, E.R.; GOMES, L. Extracellular matrix composition of different regions of knee joint cartilage in cattle. **Annals of Anatomy**, v. 179, n.7, p. 433 – 437, 1997.
- ESQUISATTO, M. A. M.; CONTRICIANI, R. E.; PIMENTEL, E. R.; GOMES, L. População de proteoglicanos em diferentes sítios anatômicos da cartilagem articular do joelho bovino. **Ensaios Pioneiros**, v. 7, n.1, p. 73 -89, 2023.

FARNDAL, R.W.; BUTTLE, D.J.; BARRET, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochemica Biophysica Acta**, v. 883, n. 2, p. 173-177, 1986.

GOLDRING, M. B. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 5, p. 1003 – 1025, 2006.

GOMES, L.; ESQUISATTO, M.A.M.; BELLINE, P.; PIMENTEL, E.R. Is there a relationship between the state of aggregation of small proteoglycans and the biomechanical properties of tissues? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 10, p. 1243-1246, 1996.

HALL, A.C.; URBAN, J.P.G.; GEHL, K.A. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. **Journal Orthopaedical Research**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 1991.

JURVELIN, J.; HELMINEN, H. J.; LAURITSALO, S. Influences of joint immobilization and running exercise on articular cartilage surfaces of young rabbits. **Acta Anatomica**, v. 122, n. 1, p. 62- 68, 1985.

KHAN, M.; REDMAN, S. N.; WILLIAMS, R.; DOWTHWAITE, G. P.; OLDFIELD, S. F.; ARCHER, C. W. The Development of Synovial Joints. **Current Topics in Developmental Biology**, v.79, n. 1, p. 1 – 36, 2007.

KIM, Y.J.; SAH, R.L.Y.; GRODZINSKY, A.J.; PLAAS, A.H.K.; SANDY, J.D. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behaviour: physical stimuli. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 311, n. 1, p. 1-12, 1994.

KIVIRANTA, I.; SÖMANEN, A.M.; JURVELIN, J.S.; AROKOSKI, J.; OETTMEIER, R.; ABENDROTH, K.; ROTH, A.J.; TAMMI, M.I. Effect of motion and load on articular cartilage in animal models. In: KUETTNER, K.E.; SCHLEYERBACH, R.; PEYRON, J.G.; HASCALL, V.C. (eds). **Articular Cartilage and Osteoarthritis**. New York: Raven Press Ltd. p. 501-510, 1992.

LIN, Z.; WILLERS, C.; XU, J.; ZHENG, M. H. The chondrocyte: biology and clinical application. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 7, p. 1971 – 1984, 2006.

LITTLE, C.B.; GHOSH, P. Variation in proteoglycan metabolism by articular chondrocytes in different joint regions is determined by post-natal mechanical loading. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 5, n. 1, p. 49 – 62, 1997.

LIU, J.; LAU, T.M.; CHOI, H.U.; TANG, L.H.; ROSENBERG, L.C. The self-association of biglycan from bovine articular cartilage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 14, p. 28366-28373, 1994.

MEYERS, R. A. Comparative anatomy of the postural mechanisms of the forelimbs of birds and mammals. **Journal of Ornithology**, v. 160, n.12, p. 869 – 882, 2019.

PALMOSKI, M.; PERRICONE, E.; BRANDT, K.D. Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. **Arthritis and Rheumatism**, v. 22, n. 10, p. 508-517, 1979.

ROBERTS, S.; WEIGHTMAN, B.; URBAN, J.P.G.; CHAPPELL, D. Mechanical and biochemical properties of human articular cartilage in osteoarthritic femoral heads and in autopsy specimens. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 68-B, n. 3, p. 278-288, 1986.

RODRIGUES, E. D.; PIMENTEL, E. R.; MOURÃO, P. A. S.; GOMES, L. Distribution of small proteoglycans and glycosaminoglycans in humerus-related articular cartilage of chickens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 38, n. 4, p. 381-390, 2005.

SAH, R.; GRODZINKY, A.; PLAAS, A.H.; SANDY, J. Effects of static and dynamic compression on matrix metabolism in artilage explants. In: KUETTNER, K.E.; SCHLEYERBACH, R.; PEYRON, J.G.; HASCALL, V.C. (eds). **Articular Cartilage and Osteoarthritis**. New York: Raven Press Ltd. p. 373-392, 1992.

SCHNEIDERMAN, R.; KERET, D.; MAROUDAS, A. Effects of mechanical and osmotic-pressure on the rate of glycosaminoglycans synthesis in the human adult femoral head cartilage: an *in vitro* study. **Journal Orthopaedical Research**, v. 4, n. 8, p.393-408, 1986.

SCOTT, R. A.; PANITCH, A. Glycosaminoglycans in Biomedicine. **Wiley Interdisciplinary Review of Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 4, p. 388 – 398, 2013.

SLOWMAN, S.D.; BRANDT, K.D. Composition and glycosaminoglycan metabolism of articular cartilage from habitually loaded and habitually unload sites. **Arthritis and Rheumatism**, v. 29, n.1, p. 88-94, 1986.

SÖMANEN, A.M.; TAMMI, M.I.; KIVIRANTA, I.; JURVELIN, J.S.; HELMINEN, H.J. Maturation of proteoglycan matrix in articular cartilage under increased and decreased joint loading. **Connective Tissue Research**, v. 16, n. 3, p. 163 -175, 1987.

TOMIOSSO, T. C.; GOMES, L.; VIDAL, B. C.; PIMENTEL, E. R. Extracellular matrix of ostrich articular cartilage. **Biocell**, v. 29, n. 1, p. 47 – 54, 2005.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of National Academy of Sciences – USA**, v. 76, n. 9, p. 4350 – 4354, 1979.

ULRICH-VINTHER, M.; MALONEY, M. D.; SCHWARZ, E.M.; ROSIER, R.; REGIS J O'KEEFE, R. J. Articular cartilage biology. **Journal American Academy of Orthopaedic Surgery**, v. 11, n. 6, p. 421-430, 2003.

URBAN, J.P.G. The chondrocyte: a cell under pressure. **British Journal of Rheumatology**, v. 33, n. 10, p. 901- 908, 1994.

VISSER, N.A.; VANKAMPEN, G.P.; DEKONING, M.H.; VANDERKORST, J.K. The effects of loaging on the synthesis of biglycan and decorin in intact mature articular cartilage *in vitro*. **Connective Tissue Research**, v. 30, n. 3, p. 241- 250, 1994.

ZINGALES, B. (1994). Analysis of protein by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: **Genes and Antigens of Parasites**, edited by MOREL, C.M., Fiocruz, Rio de Janeiro.

Recebido em: 15/11/2023.

Publicado em: 16/10/2024.